

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08939

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫にて活性化するGTP代謝経路を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic methods targeting the GTP metabolic pathway activated in malignant glioma

研究代表者

壽美田 一貴 (Sumita, Kazutaka)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70752830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫におけるGuanosine triphosphate(GTP)代謝を標的とした治療について研究を行った。細胞株などに対してMycophenolic acid (MPA)を使用すると著明に細胞内GTP量が減少する。それらを脳腫瘍細胞株や手術による摘出検体から作成した腫瘍幹細胞で検討し、MPAによる腫瘍細胞増殖抑制効果が得られた。検体中の悪性度が高いと考えられる部位ではIMPDH2が増加していることが示された。悪性神経膠腫では、IMPDH2の発現上昇により、rRNAおよびtRNAの合成能が上昇しており、IMPDH2の抑制により細胞増殖抑制効果があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性脳腫瘍のうちもっとも悪性度の高い神経膠芽腫は近年化学療法の発展に伴ってその予後は改善しつつあるものの、生存期間中央値は約15ヶ月であり治療困難な疾患である。この悪性神経膠腫の治療が困難な原因は、脳には機能の局在があり全摘出することが困難であること、分子生物学的多様性による治療抵抗性、さらには脳血流関門などによる薬剤の腫瘍への到達性が低いことが挙げられている。現時点で生命予後を著明に改善させる分子標的薬はなく、治療成績の向上には新規の治療が必要である。本研究において増殖する細胞の多くで活性化しているIMPDH2の治療標的としての可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated treatments targeting Guanosine triphosphate (GTP) metabolism in malignant gliomas. Mycophenolic acid (MPA) is a drug that has been shown to reduce GTP relative to cell lines. This MPA significantly reduces the intracellular GTP level by suppressing the production of Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH). The effect of MPA was examined on tumor stem cells prepared from brain tumor cell lines and surgically removed samples, and the tumor cell proliferation inhibitory effect of MPA was obtained. The tumor was divided and collected by surgery with reference to imaging findings such as MRI and PET. Tumors in this methionine accumulated area were shown to have increased IMPDH2 in the mRNA microarray. In malignant glioma, high expression of IMPDH2 increased the ability to synthesize rRNA and tRNA. It was found that suppression of IMPDH2 has an effect of suppressing cell proliferation.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性神経膠腫 GTP

1. 研究開始当初の背景

原発性脳腫瘍のうちもっとも悪性度の高い神経膠芽腫は近年化学療法の発展に伴ってその予後は改善しつつあるものの、生存期間中央値は約 15 ヶ月であり治療困難な疾患である。この悪性神経膠腫の治療が困難な原因は、脳には機能の局在があり全摘出することが困難であること、分子生物学的多様性による治療抵抗性、さらには脳血流関門などによる薬剤の腫瘍への到達性が低いことが挙げられている。腫瘍細胞特異的に活性、発現量が高い標的分子を発見することは治療成績の向上に非常に重要であるが、他部位の腫瘍に比べて、有効な分子標的薬の開発は遅れているのが現状である。そこで我々のグループでは、多様な遺伝子変異を標的とするのではなく、増殖する細胞の多くで活性化している分子を標的とすることを目的として研究を進めている。その1つが腫瘍細胞で増殖のために必要なエネルギーである Guanosine Triphosphate(GTP)である。我々はこれまで乳がんなどで発現が上昇し、治療標的として注目されている Phosphatidylinositol 5 phosphate 4 kinase (PI5P4K) が GTP を利用して、腫瘍細胞の増殖に影響を及ぼすことを報告してきた。(Sumita K, et al. Molecular Cell. 2016) 通常、酵素は ATP を利用することはよく知られているが、この酵素のように GTP により大きな親和性を持ち、活性を上昇させるキナーゼは非常に少ない。さらに我々は GTP そのものの産生が悪性度の高い腫瘍細胞で増加しており、この PI5P4K の活性も上昇していると考え、この PI5P4K の阻害剤の開発を行うと同時に、GTP そのものを減少させることが治療に応用できないかと考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

GTP は増殖する細胞において、DNA や RNA の原材料として使用される他、糖新生やタンパク合成においても使用され非常に重要な役割を担う。この GTP の合成には 2 つの経路があり、1 つはグルコースから作られる de novo 経路、もう一つはグアノシンから再合成される salvage 経路である。(Fig.1) 神経膠腫の発生源となるグリア細胞は増殖が非常に緩徐であるが、生後はほとんど増殖がみられないため、通常 GTP はほとんどが salvage、すなわち再利用でまかなえる量で十分と考えられる。しかし、一旦細胞が腫瘍化すると salvage 経路のみでは GTP が不足して糖から産生される de novo 経路を使用するようになる。この de novo 経路には多くの酵素が介在するが、産生の律速の酵素の1つが Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) と報告されている。この IMPDH は XMP を IMP に変換する酵素であり、この酵素の阻害剤は免疫系リンパ球の増殖を選択的に抑制するため肝臓、腎臓の移植後の免疫抑制剤としてすでに臨床で使用されている。NCBI の Unigene においても GTP 合成経路の酵素である IMPDH は正常脳組織と比較して増加していることがわかる。(Fig.2) 本研究においては、この IMPDH を抑制することにより腫瘍細胞内の GTP 量を減少させ、悪性脳腫瘍の治療に適応できるかどうかを目的とする。さらに手術で摘出した検体から RNA sequence することによりその他の GTP 産生の経路に関わる分子の同定も行う。

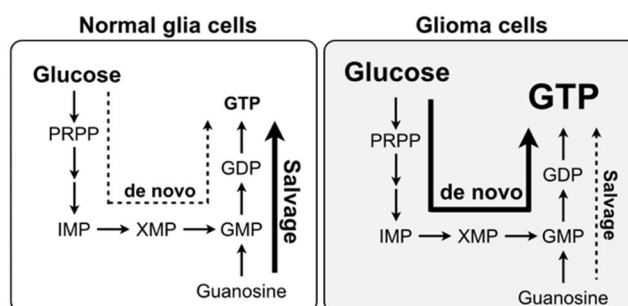


Fig.1 GTP合成経路

しかし、一旦細胞が腫瘍化すると salvage 経路のみでは GTP が不足して糖から産生される de novo 経路を使用するようになる。この de novo 経路には多くの酵素が介在するが、産生の律速の酵素の1つが Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) と報告されている。この IMPDH は XMP を IMP に変換する酵素であり、この酵素の阻害剤は免疫系リンパ球の増殖を選択的に抑制するため肝臓、腎臓の移植後の免疫抑制剤としてすでに臨床で使用されている。NCBI の Unigene においても GTP 合成経路の酵素である IMPDH は正常脳組織と比較して増加していることがわかる。(Fig.2) 本研究においては、この IMPDH を抑制することにより腫瘍細胞内の GTP 量を減少させ、悪性脳腫瘍の治療に適応できるかどうかを目的とする。さらに手術で摘出した検体から RNA sequence することによりその他の GTP 産生の経路に関わる分子の同定も行う。

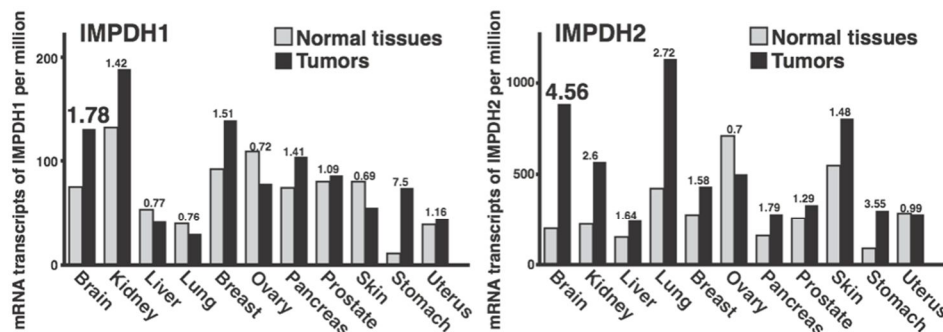


Fig.2 正常組織と腫瘍組織におけるIMPDH1、2のmRNA発現量
(数値は腫瘍組織/正常組織)

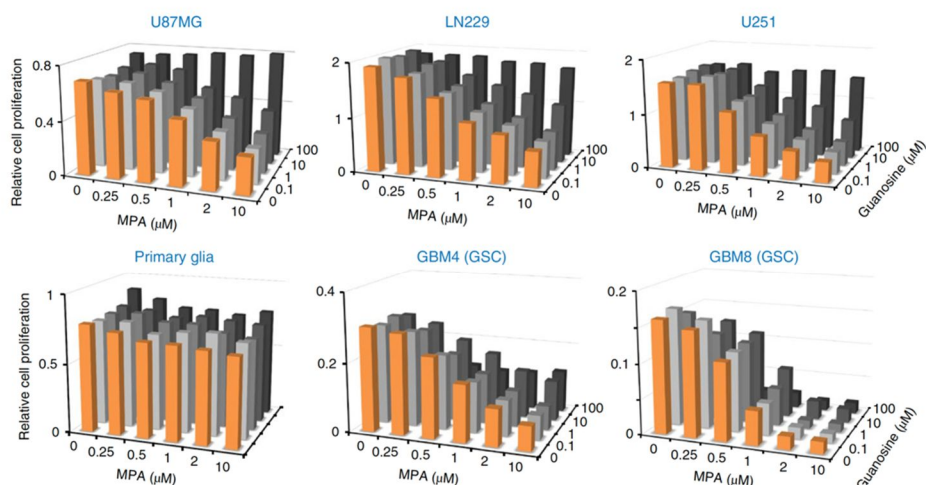
3. 研究の方法

まずは悪性神経膠腫細胞における GTP 合成経路について検討した。手術において摘出した臨床検体を用いて RNA sequence を行うことにより mRNA の発現を検討した。コントロールとなる正常細胞を摘出することは倫理的に困難であるため、当科で以前から進められていた Methionine PET で集積する部分（腫瘍細胞の増殖能が上昇している部分もしくは密度が高い部分）と、その周囲の部分に分けて腫瘍細胞を摘出して冷凍保存を行った。これらの検体の RNA sequence の結果を解析することにより、悪性度の高いと思われる部位の細胞に特有のパスウェイ解析、GTP 産生に關与する分子の発現を検討した。Covid19 の蔓延のため本施設では手術件数が激減し、当初の予定の検体は集まらなかったが、これまでに採取した検体の解析を中心に行った。次にさまざまな種類の腫瘍細胞株および摘出検体から作成した腫瘍幹細胞に対する GTP 抑制効果を GTP 産生に重要な IMPDH を抑制する Mycophenolic acid (MPA) を使用して腫瘍増殖抑制効果を検討した。これらの実験と同時に腫瘍細胞の GTP 産生を抑制した際に起こる腫瘍細胞内変化について rRNA や tRNA の合成などに着目して検討した。

4. 研究成果

腫瘍細胞における GTP 量の計測は困難であったが、RNA sequence により NCBI の Unigene で予想されたように Methionine PET が集積する部位においては GTP 合成経路で活性化する分子の発現が上昇していた。とくに IMPDH は約 3 倍程度の発現の上昇がみられた。IMPDH には 2 種類のアイソザイムが存在するが、悪性神経膠腫においては methionine が集積する部分で IMPDH2 がより発現が高いことが示唆された。上述したようにこの IMPDH2 は GTP 産生に重要であるが、腫瘍細胞においてはこの GTP 産生が rRNA や tRNA の合成に重要であり、GTP 結合タンパクである nucleostemin の安定化にも重要であることを報告した。(Kofuji S, [Sumita K](#), Sasaki AT, et al. Nature Cell Biology, 2019)

実際に IMPDH を抑制する薬剤である MPA を悪性神経膠腫由来の細胞株 (U87、LN229、U251)、手術により摘出された腫瘍検体から確立された腫瘍幹細胞 (GBM4、GBM8) およびマウスの脳から初代培養により樹立したグリア細胞に作用させ、その濃度と細胞増殖に対する効果を検討した。下の figure に示すとおり、MPA を作用させ 48-72 時間後に Crystal Violet による染色もしくは、テトラゾリウム化合物である MTS により細胞増殖を検討した。U87、LN229、U251 においては濃度依存性に細胞増殖が低下し、Guanosine を投与することによりその効果は相殺された。GBM4 および GBM8 については低濃度の MPA においても細胞増殖抑制効果が強く、Guanosine 投与においても増殖能は改善しなかった。一方グリア細胞では増殖能は低いが、MPA を投与しても細胞増殖にはほとんど影響を与えなかった。これらの結果から MPA により IMPDH の活性を抑制することにより、正常グリア細胞に影響を与えずに、腫瘍細胞、とくに脳腫瘍幹細胞に対して増殖抑制効果が得られることが期待される結果となった。



Kofuji S, [Sumita K](#), Sasaki AT, et al. Nature Cell Biology 2019;21(8) 1003-1014

以上の結果をもとに、MPA の経口投与薬であり、すでに免疫抑制剤として使用されている mycophenolate mofetil をマウス個体への投与を行う予定として研究を進めたが、Covid19 の蔓延による影響のため動物実験などの制限などがあり、本研究期間内において詳細な検討を行うことが困難であった。今後 mycophenolate mofetil のマウス脳腫瘍モデルに対する投与量や投与方法の検討が課題として考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kofuji Satoshi, Hirayama Akiyoshi, Eberhardt Alexander Otto, Kawaguchi Risa, Sugiura Yuki, Sampetrean Oltea, Ikeda Yoshiki, Warren Mikako, Sakamoto Naoya, Kitahara Shuji, Yoshino Hirofumi, Yamashita Daisuke, Sumita Kazutaka, Sasaki Atsuo T et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1003 ~ 1014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-019-0363-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------